

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL  
MAR

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
PESQUERA ACUÍCOLA



**Selección e identificación molecular de bacterias  
potencialmente probióticas aisladas del intestino y branquias  
de *Oncorhynchus mykiss* provenientes del departamento de  
Cajamarca**

TESIS

Para optar título de Ingeniero Pesquero

Autor: Br. Billy Merlin Lucano López

TUMBES, 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL  
MAR  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
PESQUERA ACUÍCOLA



**Selección e identificación molecular de bacterias  
potencialmente probióticas aisladas del intestino y branquias  
de *Oncorhynchus mykiss* provenientes del departamento de  
Cajamarca**

TESIS APROBADA EN FORMA Y ESTILO POR:

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón (Presidente)

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra (Secretario)

Mg. Marco Antonio Zapata Cruz (Vocal)

TUMBES, 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE INGENIERÍA PESQUERA Y CIENCIAS DEL  
MAR  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
PESQUERA ACUÍCOLA

TESIS DE PREGRADO

**Selección e identificación molecular de bacterias  
potencialmente probióticas aisladas del intestino y branquias  
de *Oncorhynchus mykiss* provenientes del departamento de  
Cajamarca**

Los suscritos declaramos que la tesis es original en su contenido y forma


Br. Billy Merlin Lucano López



---

EJECUTOR

Dra. Tessy Peralta Ortiz



---

ASESORA

Mg. Arnaldo Castañeda Vargas



---

COASESOR

TUMBES



"AÑO DEL FORTALECIMIENTO DE LA SOBERANÍA NACIONAL"

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

En la localidad de Tumbes, a los diez días del mes de agosto del dos mil veinte y dos, siendo las veinte horas y treinta minutos, en forma virtual, se reunió el jurado Dr. Auberto Hidalgo Mogollón (Presidente), Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra (Secretario) y Mg. Marco Antonio Zapata Cruz (Vocal); y en su condición de asesora la Dra. Tessy Peralta Ortiz (Resolución N° 084-2021/UNTUMBES-FIPCM-CF, del 30 de julio del 2021), para escuchar, deliberar, evaluar y calificar la sustentación de la tesis titulada: "Selección e identificación molecular de bacterias potencialmente probióticas aisladas del intestino y branquias de *Oncorhynchus mykiss* provenientes del departamento de Cajamarca", para optar el Título Profesional de INGENIERO PESQUERO, presentado por el:

**Br. BILLY MERLÍN LUCANO LÓPEZ**

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del sustentante y después de la deliberación, el jurado según el artículo N° 65 del Reglamento de tesis de pregrado y posgrado, declara al:

**Br. BILLY MERLÍN LUCANO LÓPEZ Aprobado** con calificativo de **Muy buena**. En consecuencia, queda **Apto** para continuar con los trámites correspondientes a la obtención del título profesional de Ingeniero Pesquero, de conformidad con lo estipulado en la Ley Universitaria N° 30220, y el Estatuto, Reglamento de tesis de pregrado y posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Se hace conocer al sustentante, que deberá levantar las observaciones finales hechas al informe de la tesis, que el Jurado le indica.

Siendo las veintiún horas con veinticinco minutos del mismo día, se dio por concluida la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta.

Tumbes, 10 de agosto del 2022

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón  
Presidente

Dr. Oscar Augusto Mendoza Neyra  
Secretario

Mg. Marco Antonio Zapata Cruz  
Vocal

C.C.:  
- Jurado (03)  
- Interesado

- Asesora: Dra. T. Peralta O.  
- Archivo Decanato.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis padres por el arduo trabajo de apoyo incondicional, a mis abuelitos fallecidos que en paz descansen; agradecer a Dios por darme la perseverancia y paciencia para afrontar tantos obstáculos.

## AGRADECIMIENTO

A la empresa Incabiotec S.A.C y también a los gerentes generales al Dr. Benoit Mathieu Diringer y al Dr. Eric Mialhe Louis, por el financiamiento de este trabajo de investigación.

También a la empresa Pezbiotec S.A.C por su asesoría constante y al gerente general Mg. Blg. Manuel Castillo Zeballos y a su equipo de investigación.

A los docentes de la Facultad de Ingeniería Pesquera y Ciencias del Mar por sus enseñanzas y experiencias invaluableles hacia todos nosotros.

Un agradecimiento especial a mi asesora Dra. Tessy Peralta Ortiz por el constante apoyo en la culminación en este trabajo de investigación; y a mi co-asesor Mg. Arnaldo Castañeda Vargas por encaminarme hacia la investigación

A mis amigos y colegas por su gran apoyo fraternal en este trabajo de investigación

A todos muchas gracias.

## ÍNDICE

	Pág
Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
I INTRODUCCIÓN.....	14
II REVISIÓN DE LITERATURA.....	16
2.1 Biología.....	16
2.2 Taxonomía.....	16
2.3 Hábitat y Distribución.....	17
2.4 Hábitos alimenticios.....	17
2.5 Aspectos reproductivos.....	17
2.6 Patologías de la trucha arcoíris ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ).....	18
2.7 <i>Yersinia ruckeri</i> .....	18
2.8 <i>Flavobacterium psychrophilum</i> .....	19
2.9 <i>Aeromona salmonicida</i> .....	19
2.10 <i>Weissella ceti</i> .....	20
2.11 Probióticos en la acuicultura.....	21
III MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Material biológico.....	22
3.2 Infraestructura, equipos y materiales.....	22
3.3 Población y muestra.....	25
3.3.1 Población.....	25
3.3.2 Muestra.....	25
3.4 Métodos.....	25
3.4.1 Lugar de ejecución.....	25
3.4.2 Toma de muestra de trucha arcoíris.....	25
3.4.3 Aislamiento de bacterias candidatas a probióticos.....	26
3.4.4 Evaluaciones bioquímicas de bacterias candidatas a probióticos.....	26
3.4.5 Tinción de Gram.....	27
3.4.6 Catalasa.....	27
3.4.7 Oxidasa.....	27
3.4.8 Actividad hemolítica.....	27
3.4.9 Tolerancia al pH gastrointestinal.....	28
3.4.10 Antagonismo con bacterias patógenas.....	28

3.4.11	Sensibilidad antibiótica .....	29
3.4.12	Ensayo proteolítico .....	29
3.4.13	Ensayo amilásico .....	29
3.4.14	Extracción de ADN bacteriano PBS 1X.....	30
3.4.15	Electroforesis .....	30
3.4.16	PCR 16S rRNA.....	31
3.4.17	Secuenciamiento y análisis de nucleótidos.....	32
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	33
4.1	Aislamiento y purificación de bacterias .....	33
4.2	Técnica para el diagnóstico de bacterias probióticas .....	33
4.3	Actividad hemolítica .....	33
4.4	Tolerancia al pH gastrointestinal .....	35
4.5	Antagonismo .....	36
4.6	Sensibilidad antibiótica .....	38
4.7	Ensayo proteolítico.....	39
4.8	Ensayo amilásico.....	40
4.9	Identificación molecular de bacterias candidatas a probióticos .....	42
V	CONCLUSIONES .....	45
VI	RECOMENDACIONES .....	46
VII	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
VIII	ANEXOS.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación y descripción de actividad hemolítica de las bacterias candidatas a probióticos. ....	28
Tabla 2. Clasificación de los antimicrobianos por diámetro de inhibición en disco de difusión.....	29
Tabla 3. Cálculos de cantidades en PCR (reacción en cadena de la polimerasa) .....	31
Tabla 4. Códigos de secuenciamiento .....	32
Tabla 5. Evaluación de bacterias candidatas a probióticos con actividad hemolítica	34
Tabla 6. Resultados de la tolerancia al pH gastrointestinal .....	35
Tabla 7. Resultados de inhibición de las bacterias patógenas <i>in vitro</i> .....	37
Tabla 8. Sensibilidad antibiótica a bacterias candidatas a probióticos.....	39
Tabla 9. Resultados del ensayo proteolítico .....	40
Tabla 10. Resultados del ensayo amilolítico .....	41
Tabla 11. Identificación molecular de bacterias candidatas a probióticos. ....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Bacterias candidatas a probióticos con halos de inhibición frente a tres patógenos.....	38
Figura 2. Ensayo amilásico. K: se observó nula producción de amilasa, representada por una coloración azul-negro .....	41
Figura 3. Gel de electroforesis (P) donde se puede observar: Control positivo (C+), Muestras (1-13), Marcador de peso 1kb (MP). .....	42

## ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Resultados de tinción de Gram, catalasa y oxidasa. ....	59
Anexo 2. Selección y purificación de bacterias candidatas a probióticos.....	60
Anexo 3. Muestras positivas del ensayo hemolítico, $\beta$ -hemólisis y $\alpha$ -hemólisis. ....	61
Anexo 4. Capacidad inhibitoria de bacterias candidatas a probióticos frente a bacterias patógenas, utilizando la técnica de pocillos. ....	61
Anexo 5. Muestras positivas de la enzima proteasa .....	62

# **Selección e identificación molecular de bacterias potencialmente probióticas aisladas del intestino y branquias de *Oncorhynchus mykiss* provenientes del departamento de Cajamarca**

Billy Merlin Lucano López <sup>1</sup>

## **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo de investigación fue seleccionar e identificar molecularmente bacterias con potencial probiótico como una alternativa al uso de antibióticos en la acuicultura. Se logró aislar 29 bacterias candidatas a probióticos de las regiones del intestino posterior y branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), a través de pruebas bioquímicas se evaluó la capacidad probiótica *in vitro* como: actividad hemolítica, resistencia a diferentes pH (2, 4 y 6.5), antagonismo frente a bacterias patógenas (*Streptococcus agalactiae*, *Aeromona hydrophila* y *Lactococcus garvieae*), ensayos proteolíticos, ensayos amilolíticos y sensibilidad a tres antibióticos permitidos en los sistemas de cultivo en el Perú (Ampicilina 10ug, Florfenicol 30ug, Tetraciclina 30ug) obteniendo 14 bacterias con potencial probiótico. Tres especies de bacterias cumplieron las características probióticas y fueron identificadas molecularmente a través del gen 16S ARNr como *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae* y *Lactococcus sp.* las que podrían ser utilizadas en la acuicultura.

Palabras clave: *Oncorhynchus mykiss*, probiótico, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus sp.*, *Enterococcus hirae*, antibiótico

<sup>1</sup>Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Pesquera de la Universidad Nacional de Tumbes

# **Selection and molecular identification of potentially probiotic bacteria isolated from the intestine and gills of *Oncorhynchus mykiss* from the department of Cajamarca**

Billy Merlin Lucano López <sup>1</sup>

## **ABSTRACT**

The main of this work was to select and identify molecularly bacteria with probiotic potential as an alternative to use of antibiotics in aquaculture. There are 29 candidate bacteria for probiotics from the hindgut regions and branches of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were recorded. Through biochemical tests, the in vitro probiotic capacity was evaluated, such as: hemolytic activity, resistance to different pH (2, 4 and 6.5), strong antagonism to pathogenic bacteria (*Streptococcus agalactiae*, *Aeromona hydrophila* and *Lactococcus garvieae*), proteolytic tests, amylolytic tests and susceptibility to antibiotics that are highly permitted in culture systems in Peru (Ampicillin 10ug, Florfenicol 30ug and Tetracycline 30ug) 14 bacteria obtained with probiotic potential. Many species of bacteria have their characteristic probiotics and have been molecularly identified through the 16S rRNA gene as *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae* and *Lactococcus sp.* where they could be used in aquaculture

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, probiotic, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus sp.*, *Enterococcus hirae*, antibiot

<sup>1</sup> Bachelor of the School of Fisheries Engineering of the National University of Tumbes

## I INTRODUCCIÓN

El sector pesquero y la acuicultura han registrado un crecimiento debido a la demanda y consumo de los alimentos acuáticos, actualmente el comercio pesquero es un 300% mayor y la producción de la acuicultura 200% mayor, esto ha provocado un aumento en el consumo per cápita, casi 40% más alto que en 1995 (Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura [FAO], 2021). Así mismo, casi todo el pescado procedente de la acuicultura se destina al consumo humano (Assefa & Abunna, 2018)

Una de las especies representativas provenientes del sector productivo acuícola peruano, es la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) con volúmenes de producción que han aumentado significativamente, siendo los principales productores nacionales: Puno, Huancavelica y Junín, superando a las producciones de langostino (*Litopenaeus vannamei*) y concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) (Ministerio de la Producción [PRODUCE], 2018; Organismo Nacional de Sanidad Pesquera [SANIPES], 2020a).

Pero, esta industria también se encuentra amenazada por brotes de infecciones virales, bacterianas y fúngicas las que han causado pérdidas económicas devastadoras en el sector acuícola mundial, en China se reportó pérdidas de hasta 750 millones de dólares en 1993, mientras que en la India se informó pérdidas de 210 millones de dólares entre 1995 y 1996. (Martínez et al., 2012).

Frente a estas infecciones, una medida rápida es la utilización de antibióticos en la acuicultura, lo que produce efectos secundarios en el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos (Assefa & Abunna, 2018). La resistencia antibiótica se adquiere de dos formas: mutación cromosómica o adquisición de plásmidos; estos mismos ocasionan ineficacia en el tratamiento y un incremento en los costos de producción de las piscigranjas obteniendo menores niveles de supervivencia (Martínez et al., 2012).

Una alternativa saludable para las poblaciones en cultivo contra enfermedades es el uso de probióticos que son utilizados ampliamente (Assefa & Abunna, 2018; Martínez et al., 2012) desde hace muchos años en humanos como en animales, principalmente bacterias ácido lácticas y levaduras. Además, se destaca que en los últimos años el sector acuícola ha promovido e incrementado su empleo debido a los efectos positivos que confieren al hospedero como, por ejemplo: potencian el sistema, disminuyen el número de microorganismos patógenos y mejoran tasas de crecimiento (Quevedo, 2020).

## II REVISIÓN DE LITERATURA

En el Perú existen varios tipos de sistemas acuícolas, en la que destacan: producción en jaulas flotantes, estanques de concreto y tierra, siendo uno de los sistemas más utilizados el de jaulas flotantes en el cultivo de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Fondo nacional de desarrollo pesquero [FONDEPES], 2004).

La trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el 2019 alcanzó una producción acuícola nacional de 48 753,70 toneladas métricas representando el 67 % de la producción anual (SANIPES, 2020a).

### 2.1 Biología

*Oncorhynchus mykiss* pertenece a la familia salmonidae descrita taxonómicamente por (Walbaum, 1792). Esta especie es de cuerpo comprimido alargado, de tamaño y condición sexual variada, coloración rojiza en las franjas laterales de ambos lados, escamas lisas de 115-130 en la fila lateral media, 16-17 branquiespinas; los machos reproductores no presentan joroba y juveniles sin marcas, tienen otolitos cíclicos de forma fusiforme y de aleta adiposa superior dorsal. Alcanzan una longitud de hasta 60 cm (FONDEPES, 2004).

### 2.2 Taxonomía

Según Walbaum (1792) lo ubica de la siguiente manera:

Nombre común: Trucha arcoíris

Clase: Osteichthyes

Orden: Clupeiforme

Familia: Salmonidae

Género: *Oncorhynchus*

Especie: *Oncorhynchus mykiss*

### **2.3 Hábitat y Distribución**

En su hábitat natural la trucha arco iris predomina en aguas frías como las riberas, lagos, lagunas y ríos pedregosos con moderadas corrientes, toleran variaciones de temperatura que oscilan entre 0 °C a 27 °C (FONDEPES, 2004) y también son nativas del Pacífico Norte de América, pertenecientes a la familia Salmonidae, fueron introducidas en diferentes países por su adaptabilidad en cautiverio y también como pesca deportiva; en la actualidad su distribución abarca gran parte del mundo como en países de Argentina, Brasil, Bolivia Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (MacCrimmon, 1971).

### **2.4 Hábitos alimenticios**

Es un depredador con hábito carnívoro, se alimenta de muchas variedades de animales, como insectos, crustáceos, moluscos, peces pequeños, huevos de peces, y también en vegetales, pero de forma más limitada (FONDEPES, 2004).

### **2.5 Aspectos reproductivos**

*O. mykiss* presenta dimorfismo sexual en su etapa de madurez, donde los machos presentan un alargamiento del maxilar inferior y una ligera curvatura en su dorso, alcanzando su madurez sexual en el espacio de 12 meses a 18 meses; sin embargo, en las hembras representa 24 meses como mínimo. Poseen reproducción ovípara, y los tiempos de reproducción son anuales iniciando en abril y extendiéndose hasta el mes de septiembre, siendo los meses de junio y julio de mayor reproducción, este desarrollo se da tanto en ambientes naturales como también en ambientes controlados o en cautiverio (FONDEPES, 2004).

## 2.6 Patologías de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

El cultivo de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en los últimos años se manifiesta como una actividad económica de rápido crecimiento en el Perú; sin embargo, como en otros países las enfermedades infecciosas es una de las principales limitantes en la producción, generando enfermedades como *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Aeromonas salmonicida* y recientemente *Weissella ceti* (Bravo & Kojagura, 2004; Castrejón-Nájera et al., 2018; FONDEPES, 2014).

## 2.7 *Yersinia ruckeri*

El agente infeccioso *Yersinia ruckeri* fue aislado múltiples veces en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en el estado de Idaho Colorado, Arizona, Nevada; California (EE. UU) emergiendo como un grave problema económico, realizando múltiples investigaciones para tratarla (Ross et al., 1966). A nivel nacional, fue reportado por primera vez en el departamento de Junín (Bravo & Kojagura, 2004).

Múltiples estudios la describen como la enfermedad de la boca roja entérica (ERM) que es producida por el agente infeccioso *Y. ruckeri* Gram negativa, causando infecciones agudas y crónicas (Austin & Austin, 2016). La enfermedad se caracteriza por producir inapetencia, exoftalmía, melanosis y hemorragias subcutáneas alrededor de la boca (Kumar et al., 2015). Además, también afecta a peces marinos y de agua dulce en rangos mayores a 15 °C, en el inicio las mortalidades suelen no ser tan significativas pero su progresión continua provoca altas mortalidades (Wrobel et al., 2019).

El tratamiento autorizado para estos tipos de enfermedades actualmente es el uso de oxitetraciclina, ácido oxolínico, amoxicilina, sulfanomida potenciadas con trimetoprima (Organización Mundial de Sanidad Animal [OIE], 2019).

## **2.8 *Flavobacterium psychrophilum***

*Flavobacterium psychrophilum* es una bacteria Gram negativa conocida como la enfermedad del síndrome del alevín en la trucha arco iris (RTFS) o también denominado la enfermedad bacteriana de aguas frías (BCWD), esta enfermedad desafía el bienestar de los peces y la economía internacional en la acuicultura, distribuyéndose en diferentes países, debido a factores ambientales y sus medios de transmisión (horizontal y vertical) a través de las branquias, piel y vías gastrointestinales (Muñoz-Atienza et al., 2019).

Algunos signos clínicos de la enfermedad en la trucha arcoíris son: lesiones cutáneas ulceradas en la región dorsal y órganos internos; lesiones moderadas a graves en el bazo y riñón (León et al., 2008).

Actualmente no existe una vacuna eficaz contra la enfermedad, pero se han establecido tratamientos con antibióticos para inhibir o neutralizar el agente infeccioso *F. psychrophilum*. Además, la administración de antibióticos por vía oral es el tratamiento más factible en un diagnóstico temprano y directo (Starliper, 2011). Mientras tanto, En Canadá, el Florfenicol (FFN) y la Oxitetraciclina (OTC) son actualmente los dos únicos antimicrobianos de uso común, y que tienen cierta eficacia contra la enfermedad, mencionando al Florfenicol como el primer antimicrobiano utilizado en los cultivos de trucha arco iris (J. S. Lumsden comunicación personal, marzo de 2019).

## **2.9 *Aeromonas salmonicida***

*Aeromonas salmonicida* sbsp. es una bacteria Gram negativa causante de la enfermedad denominada forunculosis que afecta a salmónidos y a otras especies acuáticas, además es un problema que afecta la producción de trucha arcoíris en el mundo, provocando altas mortalidades y morbilidad (Janda & Abbott, 2010). Los signos clínicos que presenta son: lesiones ulcerativas, letargia, sepsis hemorrágica e inapetencia (Dallaire-Dufresne et al., 2014).

Los antibióticos que están aprobados por la Dirección de Medicamentos veterinarios de Health Canadá (VDD) para el tratamiento de forunculosis, son las siguientes: oxitetraciclina, florfenicol [un análogo del cloranfenicol], sulfadimetoxina / ormetoprim y sulfadiazina / trimetoprim (Trudel et al., 2016). Cabe mencionar que el uso intensivo e incorrecto de estos antibióticos en el tratamiento de enfermedades emergentes está relacionado con cepas resistentes a antibiótico.

### **2.10 *Weissella ceti***

El primer caso de infección por *Weisselosis* se reportó en una granja de truchas arco iris en China en el 2009 (Liu et al., 2009 citado en Castrejón-Nájera et al., 2018). La emergencia de *Weisselosis* en el Perú, se reportó por primera vez en Puno en el lago Titicaca durante la temporada pluvial, las mortalidades se presentaron en temperaturas superiores a 15 °C en peces mayores a 100 g (Medina et al., 2020).

Los signos clínicos que presenta la enfermedad en el cultivo de trucha arcoíris son: melanosis, distensión abdominal, exoftalmía, opacidad corneal, branquias pálidas, manchas blanquecinas multifocales y diseminadas en el hígado; hemorragias en la vejiga natatoria y superficie parietal del músculo (Castrejón-Nájera et al., 2018).

La alternativa más eficiente para contrarrestar a la *Weisselosis*, se realizó en Brasil donde dos vacunas candidatas, denominadas adyuvante oleoso y bacterina, durante un periodo de 60 días post infección en ambientes controlado, la vacuna adyuvante oleoso logro mostrar una protección del 92%, superando a la vacuna de bacterina con un 58% (Costa et al., 2015).

## **2.11 Probióticos en la acuicultura**

Los probióticos son una alternativa viable en la acuicultura, ofreciendo beneficios al hospedero como: ayudando a mejorar la función de la barrera epitelial, secretando sustancias antibacterianas e inhibiendo patógenos (Rijkers et al., 2010).

Estudios recientes concuerdan que los microorganismos probióticos más utilizados en la acuicultura son las bacterias ácido lácticas (Quevedo, 2020; Xia et al., 2019). Estas bacterias son aisladas de diferentes partes del organismo, comúnmente en intestino y branquias. Sin embargo, se están realizando pruebas postbióticas (productos o subproductos metabólicos) que son compuestos bioactivos secretados por bacterias ácido lácticas vivas, que podrían ofrecer un beneficio bioquímico y fisiológico al hospedero, volviéndose una alternativa potencial en su utilización (Aguilar-Toalá et al., 2018; Mora-Sánchez et al., 2020).

## III MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Material biológico.

- 5 ejemplares de trucha arcoíris (*Onconrhyinchus mykiss*)

### 3.2 Infraestructura, equipos y materiales.

#### Infraestructura

- Laboratorio de microbiología y biología molecular
- Área de microbiología
- Área de extracción de ADN
- Área de PCR

#### Equipos

- 1 cámara de flujo laminar horizontal clase I
- 1 microscopio binocular con resolución de 400x
- 1 termociclador de PCR
- 1 termoblock
- 1 autoclave en PA/ °C
- 1 vortex 240 W.
- 1 balanza analítica con precisión de 0,01 g.
- 1 incubadora
- 1 centrifugadora
- 1 refrigeradora de -20 °C
- 1 microondas

#### Insumos

- 1 frasco de medio TSB
- 1 frasco de medio TSA
- 1 frasco de medio MRS caldo y Agar

- 2 frascos de hipoclorito de sodio al 5% comercial
- 1 frasco de medio agar almidón (amilasa)
- 1 frasco de medio agar leche (proteólisis)
- 1 frasco de medio agar sangre (hemolisis)
- 1 frasco de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 1 frasco de NaOH
- 1 frasco de HCl
- 1 frasco de pruebas de oxidasa
- 1 frasco de oxitetraciclina, cloranfenicol y amoxicilina
- 1 frasco de agua ultrapura
- 1 frasco de azul violeta
- 1 frasco de Lugol
- 1 frasco de acetona
- 1 frasco de safranina
- Taq buffer 10x
- MgCl, MgSO<sub>4</sub>
- Dntp's
- Primers Forward y Reverse
- Taq polimerasa
- Safe View classic
- Agarosa
- TAE 1X
- 1 galón de agua destilada

### **Materiales**

- 1 pH-metro
- 1 bagueta y un vaso de precipitación
- 1 probeta graduada de 50 ml
- 1 mascarilla anti-gas certificada
- 1 juego de pipetas de 0.5-10 ul, 20-200 ul, 100-1000 ul.
- 4 gradillas para microtubos de 1.5 ml y 0.2 ml
- 1 bolsa de microtubos de 1.5 ml y de 0.2 ml

- 3 frascos de vidrio graduados de laboratorio
- 1 gaveta mediana
- 2 tijeras medianas
- 1 rollo de parafilm
- 1 rollo de bolsas de 40 x 25
- 4 cintas masking type grande
- 5 cintas adhesivas
- 2 cintas de embalaje grande
- 6 rollos de papel toalla
- 1 rollos de papel aluminio
- 6 jeringas de extracción de sangre.
- 1 cámara fotográfica
- 70 placas Petri
- 2 rotuladores
- 5 rollos de papel Kraft
- 1 bolsa de falcón de 50 ml y 15 ml
- 1 cooler de hielo seco
- 6 cajas de puntas de 1000 ul
- 6 cajas de puntas de 100-200 ul
- 2 cajas de puntas de 10 ul
- 6 racks de laboratorio
- 2 cajas de guantes de nitrilo talla L
- 1 caja de mascarillas de tela
- 4 frascos de alcohol de 96 °C
- 1 rociador de alcohol
- 1 paquete de láminas portaobjetos
- 1 paquete de láminas cubreobjetos

### **3.3 Población y muestra**

#### **3.3.1 Población.**

La población de estudio está conformada por todas las truchas arcoíris (*Oncorhynchus mikyss*) de las piscigranjas de Cajamarca.

#### **3.3.2 Muestra.**

La muestra está conformada por 5 truchas arcoíris (*Oncorhynchus mikyss*) entre hembras y machos de las piscigranjas de Cajamarca.

### **3.4 Métodos**

#### **3.4.1 Lugar de ejecución.**

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de biología molecular de la entidad privada Incabiotec S.A.C ubicado en el departamento de Tumbes, en las coordenadas geográficas Latitud: -3.5724199450489293 y Longitud: -80.45843642384656

#### **3.4.2 Toma de muestra de trucha arcoíris.**

Se realizó la selección de los peces sin mostrar signos clínicos de alguna enfermedad, fueron capturados con la ayuda de un chayo y fueron colocados en un envase de Tecnopor con 8 000 ml para mantenerlos vivos durante el traslado (Quispe, 2017). Después de ser trasladados al área de disección los peces fueron anestesiados con eugenol a una concentración de aproximadamente de 50 ppm (Keene et al., 1998).

Posteriormente se realizó la desinfección con etanol al 70% y se procedió a diseccionar la cavidad peritoneal cortando pequeños fragmentos del intestino posterior los que fueron introducidos en tubos Falcon de 50 ml con 15 ml de Man

Rogosa Sharpe Broth (MRS). Luego se realizó un frotis branquial utilizando hisopos estériles colocados también en tubos Falcon de 50 ml con 15 ml de MRS Broth (Castañeda et al., 2018; Quispe, 2017).

### **3.4.3 Aislamiento de bacterias candidatas a probióticos**

Las muestras de branquias e intestino se transportaron durante 24 horas en un Tecnopor, con gel pack desde Cajamarca – Chiclayo – Tumbes. En el laboratorio se procedió a reactivar las muestras codificadas en medio MRS Broth y se incubó durante 24 h a 30 °C.

Se realizaron diluciones seriadas (desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ) y se sub cultivaron en placas Petri con medio agar MRS a 30 °C durante 24 h, transcurrido el tiempo de proliferación de las bacterias fueron visualizadas microscópicamente (Castañeda et al., 2018). Obtenidas las colonias puras se conservaron en glicerol al 15% del volumen total a -20 °C, obteniendo las muestras stock para su evaluación y mayor durabilidad hasta la culminación de las pruebas microbiológicas.

### **3.4.4 Evaluaciones bioquímicas de bacterias candidatas a probióticos**

Las siguientes evaluaciones *in vitro* permitieron caracterizar bacterias por tinción de Gram, en forma, color y tamaño; también seleccionar bacterias tolerantes al pH gastrointestinal, pruebas oxidativas y catalíticas.

### **3.4.5 Tinción de Gram**

Para la técnica de tinción de Gram se utilizó cristal violeta por un minuto, Lugol por un minuto, acetona por treinta segundos y safranina por un minuto (Bartholomew & Mittwer, 1952). Luego se procedió a observar en el microscopio a 1000X.

### **3.4.6 Catalasa**

Se realizó un frotis de la colonia bacteriana que fue colocado en un portaobjeto con una gota de peróxido de hidrogeno. Posteriormente con un tiempo de espera de 5 minutos se observó la reacción química para determinar bacterias aeróbicas o anaeróbicas.

### **3.4.7 Oxidasa**

La evaluación se realizó en tirantes de citocromo c oxidasa de la marca comercial Mikrobiologie Bactiden® Oxidase, un leve frotis de la colonia fue frotado en el tirante con un tiempo de espera de 5 minutos, y la revelación de los resultados se evaluó cualitativamente: color crema como resultado negativo, y color fucsia como resultado positivo.

### **3.4.8 Actividad hemolítica**

Se cultivo en placas de agar sangre al 5% p/v por triplicado por el método de estriado y se incubó durante 48 h a 30 °C (Do Vale Pereira et al., 2017). La actividad hemolítica de las bacterias candidatas a probióticos fue clasificada y descrita de acuerdo a Rodríguez, 2009 (Tabla 1). Posteriormente se seleccionaron las bacterias clasificadas como gammas hemolíticas, consideradas como no patógenas.

Tabla 1. Clasificación y descripción de actividad hemolítica de las bacterias candidatas a probióticos.

Clasificación	Descripción
$\alpha$ -hemólisis o hemólisis incompleta	Clarificación parcial alrededor de las colinas, coloración verdosa en el medio de cultivo.
$\beta$ -hemólisis o hemólisis verdadera	Clarificación con actividad hemolítica total alrededor de las colonias en el medio de cultivo
$\gamma$ -hemólisis	Clarificación del medio de cultivo alrededor de las colonias sin actividad

#### 3.4.9 Tolerancia al pH gastrointestinal

Alícuotas del medio MRS caldo fueron ajustados hasta los valores de pH 2.0, 4.0 y 6.5 (caldo MRS-control) con ayuda de HCl y NaOH, se agregó 20 ul de bacteria y se incubó a 30 °C durante 24 h (Quevedo, 2020). Seleccionando las cepas bacterianas con crecimiento igual o menor a pH 4.

#### 3.4.10 Antagonismo con bacterias patógenas

Las bacterias patógenas *Aeromona hydrophila*, *Lactococcus garviae* y *Streptococcus agalactiae* aisladas de peces, fueron cultivadas en medio Tryptic Soy Broth (TSB) durante 24 h y se incubó a 30 °C, después del crecimiento bacteriano se inoculó 100 ul de cada bacteria patógena en placas del medio Tryptic Soy Agar (TSA) por triplicado mediante el método de esparcimiento, luego se realizaron pocillos con la ayuda de puntas estériles de pipeta y se agregó 30 ul ( $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^8$  UFC/ml) de las bacterias candidatas a probióticos y se incubó a 30 °C durante 24 h, la actividad inhibitoria fue calculada en milímetros (mm), siendo positivas las zonas claras alrededor de la colonia (Zatán et al., 2020).

### 3.4.11 Sensibilidad antibiótica

Para las pruebas de sensibilidad antibiótica se utilizó Cloranfenicol, Ampicilina y Tetraciclina, previamente las bacterias fueron activadas en medio MRS Broth, después esparcidas por toda la placa en el medio Mueller Hinton agar por duplicado, posteriormente los discos de antibióticos (Cloranfenicol, Ampicilina y Tetraciclina) de la marca Becton Dickinson, BBL fueron colocados, y se incubaron a 30 °C durante 48 h (Gutiérrez, 2016). Los resultados se interpretaron por el diámetro de inhibición como: Sensible(S), Intermedio (I) y Resistente (R) (Tabla 2) (Coyle et al., 2005).

Tabla 2. Clasificación de los antimicrobianos por diámetro de inhibición en disco de difusión

Método	Sensible	Intermedio	Resistente
Difusión de Disco (mm)	$\geq 21$	17-20	$\leq 16$
CIM (ug/mL)	$\leq 2$	4	$\geq 8$

### 3.4.12 Ensayo proteolítico

La actividad proteolítica se evaluó sobre el medio agar Skim Milk (10%) que se utilizó como fuente de proteína y fue trabajado por triplicado. Se procedió a sembrar por estría las bacterias candidata a probiótica y se incubó a 30 °C durante 24 h (Castañeda et al., 2018). Los resultados positivos se observaron por halo transparente alrededor de la bacteria estriada.

### 3.4.13 Ensayo amilásico

La actividad amilolítica se determinó en cultivos de agar almidón (2.5%) por triplicado, las bacterias candidatas a probióticos se sembró por estría en agar almidón y se incubó a 30 °C durante 24 h, después del crecimiento bacteriano en las placas agar almidón se vertió yodo de Lugol al 1%, donde se debe observar la producción

amilolítica como una zona clara alrededor de la estría (+) o sin la presencia de presencia de esta zona clara (-) (Reda et al., 2018).

#### **3.4.14 Extracción de ADN bacteriano PBS 1X**

Se utilizó el protocolo de extracción PBS 1X estandarizado en el laboratorio de biología molecular de Incabiotec S.A.C:

1. Microcentrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos los tubos que contienen el medio de cultivo en caldo con la bacteria cultivada.
2. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 500 µl de PBS 1X.
3. Vortexear las muestras hasta disolver el pellet.
4. Microcentrifugar a 10000 rpm por 2 minutos.
5. Eliminar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 200 µl de TE 1X.
6. Llevar a ebullición por 10 minutos.
7. Inmediatamente colocar sobre hielo por 5 minutos.
8. Microcentrifugar a 10 000 rpm por 2 minutos.
9. Transferir el sobrenadante (100 µL aproximadamente) a un nuevo microtubo.
10. Agregar 1 µl de ARNasa (0.1 mg/ml).
11. Incubar 65 °C por 15 minutos o 1 hora a 37 °C.
12. Realizar la dilución (dependiendo de la concentración) con agua ultra pura.
13. Tomar 1 µl para la PCR.

#### **3.4.15 Electroforesis**

Se realizó la preparación de un gel de agarosa al 1.5% en 50 ml de TAE 1x agregando 2.5 ul de Safe View classic (Castañeda et al., 2018), luego se vertió en un molde horizontal de plástico que solidifica en 15 minutos, después se tomó 4 ul de las

muestras amplificadas y se homogenizó cada una con 1 ul de buffer de carga y colocadas en los pocillos del gel respectivamente. La fuente de poder fue programada a 110 Voltios (V) y 160 Amperios (AMP) por 25 minutos, transcurrido el tiempo se transfirió a una cámara ultravioleta (UV) donde se observó las bandas expresadas por intensidad.

### 3.4.16 PCR 16S rRNA

Obtenidos los resultados anteriores se procedió a evaluar los reactivos a utilizar en el proceso de la PCR 16S rRNA calculando las cantidades por muestra (Tabla 3) y utilizando cebadores universales F518 (*Forward* 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') y R800 (*Reverse* 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'), en las siguientes condiciones: un ciclo a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 45 s, 72 °C durante 1 min y 30 s, y un ciclo final de 72 °C durante 6 min (Castañeda et al., 2018).

Tabla 3. Cálculos de cantidades en PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

PCR 16S rRNA /Muestra			
Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final	Cantidades (µl)
Aup	-	-	17.3 ul
Taq buffer (Promega)	5x	1x	5 ul
Dntp's	10 mM	0.2 mM	0.5 ul
Forward	15 µM	0.3 µM	0.5 ul
Reverse	15 µM	0.3 µM	0.5 ul
Taq polymerase	-	-	0.2 ul
DNA Sample	-	-	1ul
TOTAL			25 ul

### 3.4.17 Secuenciamiento y análisis de nucleótidos

Los amplicones positivos, fueron enviados a la empresa MacroGen, para el servicio de secuenciamiento de doble cadena Fw (Forward) y Rv (Reverse) los códigos de las bacterias se alinearon con los códigos de secuenciamiento enviados a MacroGen (Tabla 4). Las secuencias obtenidas fueron procesadas en el programa informático BioEdit, y los análisis de identificación molecular fueron a través de la herramienta NCBL Blast: Nucleotide sequence.

Tabla 4. Códigos de secuenciamiento

Nº	Cepario	Cod. Secuenciamiento
1	IP5R1	BT8.8
2	HB4(3)	BT11
3	IP5(3)	BT10
4	HB4(1)	BT9
5	IP2(6)	BT15
6	HB4(5)	BT2
7	HB4(2)	BT6
8	HB5(5)	BT12
9	IP2(4)	BT13
10	IP5R2	BT4
11	IP5(1)	BT8
12	IP3(1)	BT1
13	IP1(5)	BT3

## IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Aislamiento y purificación de bacterias

Se aisló un total de 29 cepas bacterianas, 14 a partir del intestino posterior y 15 de branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) siendo cantidades menores a las obtenidos por (Quevedo, 2020) quien reportó un aislamiento de 200 cepas bacterianas cultivadas en MRS agar a partir de la mucosa intestinal de trucha arcoíris y Pérez et al., (2011) quienes reportaron 335 bacterias aisladas del mucus intestinal, branquial y cutáneo de trucha arcoíris, con el fin de obtener potenciales bacterias probióticas.

### 4.2 Técnica para el diagnóstico de bacterias probióticas

En la técnica de tinción de Gram se identificaron 12 bacterias Gram negativas y 17 Gram positivas; también se evidenció dos morfologías: cocos (17.25%) y cocobacillus (82.75%); así mismo en Gutiérrez, (2016) menciona que seleccionó aquellas bacterias cocos Gram positivos como candidatas a probióticos.

Además, en el ensayo de catalasa se obtuvieron dos resultados positivos y en el ensayo de oxidasa fue negativo, los datos difieren con Quevedo, (2020), que obtuvo oxidasa y catalasa negativa para todos los aislados bacterianos. Sin embargo, se utilizó MRS Broth y agar para el aislamiento de bacterias ácido-lácticas también usado por Gutiérrez, (2016) pero diferente al usado por (Hoseinifar et al., 2018, Ringø et al., 2018) quienes emplearon el medio M17 específicamente para bacterias del género *Lactococcus sp.*

### 4.3 Actividad hemolítica

Se obtuvieron 11 aislados bacterianos con actividad  $\beta$ -hemólisis, 1 con actividad  $\alpha$ -hemólisis y 17 con actividad  $\gamma$ -hemólisis, estas últimas se seleccionaron como cepas

candidatas a probióticos por no presentar características de virulencia como la actividad hemolítica (Tabla 5) esta cantidad fue menor a la registrada por Quevedo, (2020) quien reportó 10 de 14 aislados bacterianos no generaron ningún tipo de actividad hemolítica y fueron considerados como candidatas a probióticos. Diferentes estudios demuestran que las bacterias que no poseen actividad hemolítica son consideradas como potenciales candidatas a probióticos (Castañeda et al., 2018; Do Vale Pereira et al., 2017)

Tabla 5. Evaluación de bacterias candidatas a probióticos con actividad hemolítica

Código de bacteria	Actividad Hemolitica			Código de bacteria	Actividad Hemolitica		
	$\alpha$ -hemólisis	$\beta$ -hemólisis	$\gamma$ -hemólisis		$\alpha$ -hemólisis	$\beta$ -hemólisis	$\gamma$ -hemólisis
IP4(2)	+	-	-	HB3(3)	-	+	-
HB5(5)	-	-	+	HB4(5)	-	-	+
HB5(6)	-	-	+	IP2(2)	-	-	+
IP2(5)	-	-	+	IP2(6)	-	-	+
IP2(4)	-	-	+	HB4(2)	-	-	+
IP1(5)	-	-	+	IP5(1)	-	-	+
IP5R2	-	-	+	IP3(1)	-	-	+
HB4(3)	-	-	+	HB3(5)	-	+	-
HB4(4)	-	+	-	IP1(3)	-	+	-
IP5(3)	-	-	+	HB5(4)	-	+	-
IP5(2)	-	-	+	HB5(3)	-	+	-
HB4(1)	-	-	+	HB3(4)	-	+	-
HB3(2)	-	+	-	HB5(2)	-	+	-
HB3(1)	-	+	-	HB5(1)	-	+	-
IP5R1	-	-	+	-	-	-	-

#### 4.4 Tolerancia al pH gastrointestinal

Se registró que las bacterias con los códigos IP2(5) e IP2(2) crecieron a la concentración de pH 6.5 (control) luego de 24 h; sin embargo, no lograron crecer a pH 2 ni pH 4, por lo cual fueron descartadas como candidatas a probióticos (Tabla 6); cabe mencionar que Quevedo, (2020) y Gutiérrez, (2016) aplicaron el criterio de tolerancia a la acidez con pH 2.5 y a la alcalinidad de pH 8.5 debido a que estas condiciones son similares al tracto gastrointestinal y son características buscadas en las cepas candidatas a probióticos.

Los resultados del presente estudio tienen similitud a lo descrito por Rodríguez, (2009) que sometió a 51 bacterias candidatas a probióticos a diferentes pH, donde 42 bacterias fueron seleccionadas por resistir un pH 2 y pH 4; por otro lado en Reda et al., (2018) evaluaron 9 bacterias candidatas a probióticos que fueron sometidas a concentraciones de pH 1, pH 3 y pH 7 (control), mostrando crecimiento a todas las concentraciones de pH; sin embargo, hubo diferencias significativas en el recuento bacteriano (UFC/ml) lo que indica que, los de mayor rango de crecimiento, tendrán mejores características como bacterias potencialmente probióticas.

Tabla 6. Resultados de la tolerancia al pH gastrointestinal

N°	Código	pH2	pH4	pH 6.5
1	IP1(5)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
2	IP2(4)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
3	IP2(5)	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento
4	IP5R2	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
5	IP3(1)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
6	IP5(1)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
7	IP2(2)	Sin crecimiento	Sin crecimiento	Crecimiento
8	IP2(6)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento

9	HB4(2)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
10	HB5(5)	Sin crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
11	HB5(6)	Sin crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
12	HB4(3)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
13	IP5(3)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
14	IP5(2)	Sin crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
15	HB4(1)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
16	IP5R1	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento
17	HB4(5)	Crecimiento	Crecimiento	Crecimiento

#### 4.5 Antagonismo

Se evaluaron 15 bacterias candidatas a probióticos, 7 presentaron actividad inhibitoria frente a tres patógenos: *Streptococcus agalactiae* (SAG), *Lactococcus garvieae* (L3-1) y *Aeromona hydrophila* (A.H) (Tabla 7). Los resultados en la Figura 1 muestran que las cepas IP1(5), IP3(1), HB4(5) Y HB4(1), con halos de inhibición de 6.3, 3, 2.6 y 2.6 mm, respectivamente fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Streptococcus agalactiae*. Las cepas IP5(3), HB4(2) y HB4(1), con halos de inhibición de 6.3, 6.3 y 5 mm respectivamente, fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Lactococcus garvieae*. Mientras que las cepas las cepas IP3(1), IP2(6) y HB4(5), con halos de 4, 3.3, y 2.6 mm respectivamente, inhibieron el crecimiento de *Aeromonas hydrophila*

Estos resultados difieren por lo dicho en Gutiérrez, (2016) que obtuvo 3 bacterias candidatas a probióticos aisladas de tilapia con actividad inhibitoria frente a *Streptococcus agalactiae* con halos de inhibición de 35 mm. Así mismo, Pérez et al., (2011) evidenció 8 bacterias candidatas a probióticos aisladas del intestino, 2 de branquias y 1 del mucus de trucha arcoíris con actividad antagónica frente a *Lactococcus garvieae*, con halos de inhibición de 15 y 20 mm. Por otro lado, en Robertson et al., (2000) utilizaron la bacteria *Carnobacterium sp* aislada del salmón

como candidata a probiótico, mostrando actividad antagónica frente al patógeno *Aeromonas hydrophila*.; sin embargo, utilizaron la metodología por rayas cruzadas a diferencia del presente estudio que fue por pocillos (mm).

Tabla 7. Resultados de inhibición de bacterias patógenas *in vitro*

Nº	Código	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Lactococcus garvieae</i>	<i>Aeromona hydrophila</i>
1	IP5R1	-	-	+
2	HB4(3)	+	-	-
3	IP5(3)	+	++	+
4	HB4(1)	+	++	+
5	IP5(2)	-	-	-
6	IP2(6)	+	+	+
7	HB4(5)	+	+	+
8	HB4(2)	+	++	+
9	HB5(5)	+	-	-
10	HB5(6)	-	-	-
11	IP2(4)	-	++	+
12	IP5R2	-	++	+
13	IP5(1)	-	++	+
14	IP3(1)	+	+	++
15	IP1(5)	++	++	+

(-) Sin halo de inhibición, (+) halo de inhibición de 1 a 3 mm, (++) halo de inhibición de 4 a 7 mm.

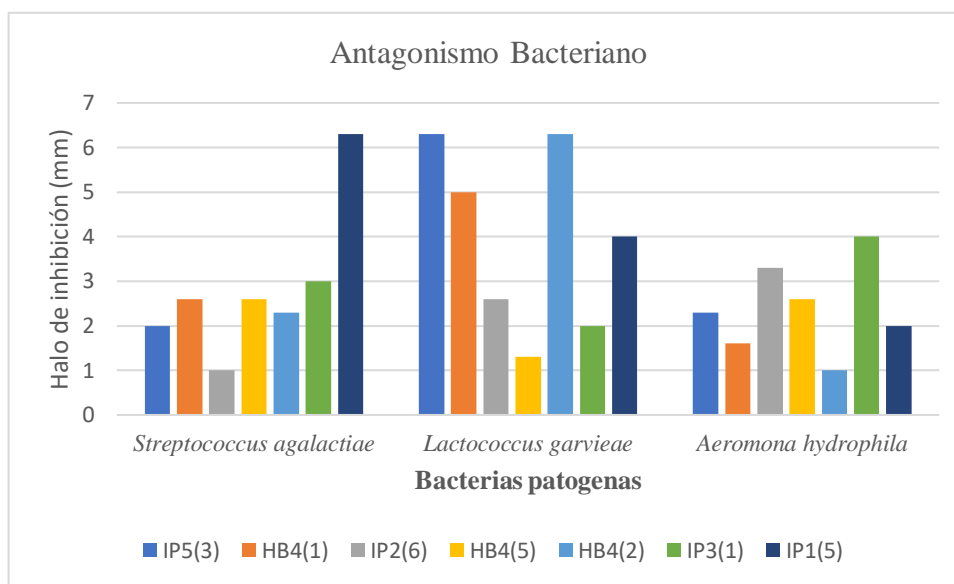


Figura 1. Bacterias candidatas a probióticos con halos de inhibición frente a tres patógenos

#### 4.6 Sensibilidad antibiótica

Los resultados obtenidos del antibiograma determinaron que dos cepas HB5(5) y IP3(1) son intermedia sensible y sensible a Ampicilina, la cepa IP5(2) sensible a Florfenicol y la cepa IP5R1 intermedia sensible y sensible a Tetraciclina (Tabla 8).

Por otro lado, los resultados del presente estudio difieren de los obtenidos en Castañeda et al., (2018) que obtuvo cepas resistentes a Tetraciclina. Sin embargo, fueron similar con Quevedo, (2020) que reportó bacterias sensibles a Florfenicol, Amoxicilina, Eritromicina y Oxitetraciclina. De igual manera, Gutiérrez, (2016) obtuvo bacterias sensibles a Amoxicilina, Tetraciclina y Cloranfenicol con halos superior a 2 mm, indicando que el antibiótico es efectivo.

La OIE, (2019), establece a la los antibióticos utilizados en este estudio como antimicrobianos importante para el tratamiento enfermedades bacterianas. De la misma manera estos antibióticos están permitidos por SANIPES entidad encargada en el Perú de autorizar y regular los antibióticos veterinarios utilizados en la acuicultura (Instituto tecnológico pesquero [ITP], 2008; SANIPES, 2021; SANIPES, 2020b).

Tabla 8. Sensibilidad antibiótica a bacterias candidatas a probióticos

Código de bacterias	Antibióticos		
	AMP 10 µg	FFC 30 µg	TE 30 µg
IP5(1)	S	I	S
IP5(3)	S	I	S
HB4(2)	S	I	S
IP5R1	S	I	I
IP5R2	S	I	S
IP1(5)	S	I	S
HB4(5)	S	I	S
HB4(3)	S	I	S
HB4(1)	S	I	S
HB5(5)	I	I	S
IP2(4)	S	I	S
IP2(6)	S	I	S
IP3(1)	I	I	S

#### 4.7 Ensayo proteolítico

13 bacterias candidatas a probióticos revelaron zonas claras alrededor de las estrías confirmando así la enzima proteasa (Tabla 9). Estos resultados son similares en lo descrito en Zatán et al., (2020) que obtuvieron todas las bacterias positivas, con zonas claras alrededor de los pocillos; por otro lado, en Castañeda et al., (2018) obtuvieron fuerte actividad proteolítica en 2 bacterias candidatas a probióticos.

Tabla 9. Resultados del ensayo proteolítico

Número	Código	Repeticiones		
		P1	P2	P3
1	IP5R1	+	+	+
2	HB4(3)	+	+	+
3	IP5(3)	+	+	+
4	HB4(1)	+	+	+
5	IP2(6)	+	+	+
6	HB4(5)	+	+	+
7	HB4(2)	+	+	+
8	HB5(5)	+	+	+
9	IP2(4)	+	+	+
10	IP5R2	+	+	+
11	IP5(1)	+	+	+
12	IP3(1)	+	+	+
13	IP1(5)	+	+	+

#### 4.8 Ensayo amilásico

13 bacterias candidatas a probióticos mostraron ausencia de la enzima amilasa (Tabla 10), presentando una coloración azul-oscura (Figura 2). Sin embargo, estos datos son diferentes en Reda et al., (2017) que obtuvieron 5 bacterias con la enzima amilasa con la capacidad de hidrolizar el almidón, con halos de inhibición mayores de  $7.66 \pm 1.5$  mm y el más bajo  $4.9 \pm 1.5$  mm respectivamente.

Recientes estudios han revelado, que ciertas bacterias ácido lácticas son antidiabéticas, estando relacionado con la baja actividad amilásica (Yeganeh et al., 2021). Además, estudios en Mondal et al., (2010) han demostrado que las mayores

bacterias con actividad amilolítica, están presentes en el intestino anterior, en comparación con el posterior, por lo cual explicaría en este estudio la ausencia de la enzima amilasa.

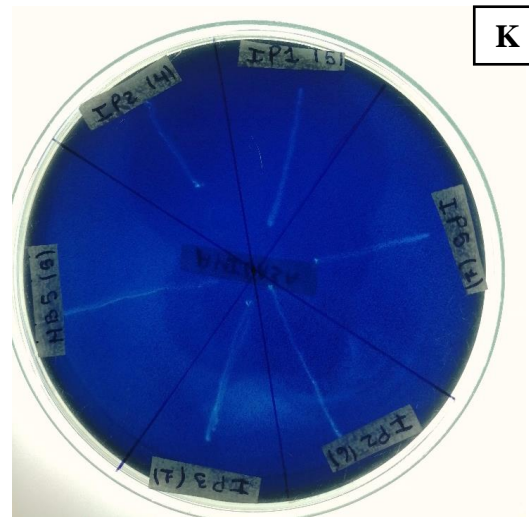


Figura 2. Ensayo amilásico. K: se observó nula producción de amilasa, representada por una coloración azul-negro

Tabla 10. Resultados del ensayo amilolítico

Nº	Código	Repeticiones		
		P1	P2	P3
1	IP5R1	-	-	-
2	HB4(3)	-	-	-
3	IP5(3)	-	-	-
4	HB4(1)	-	-	-
5	IP2(6)	-	-	-
6	HB4(5)	-	-	-
7	HB4(2)	-	-	-
8	HB5(5)	-	-	-

9	IP2(4)	-	-	-
10	IP5R2	-	-	-
11	IP5(1)	-	-	-
12	IP3(1)	-	-	-
13	IP1(5)	-	-	-

#### 4.9 Identificación molecular de bacterias candidatas a probióticos

Muestras positivas amplificadas para el gen 16S rRNA (Figura 3). Los análisis de secuenciación por el método de Sanger se realizaron a través de la herramienta NCBL Blast: Nucleotide sequence, indicaron similitud de las cepas candidatas a probióticos con *Lactococcus lactis*, *Lactococcus sp.* y *Enterococcus hirae* (Tabla 11).

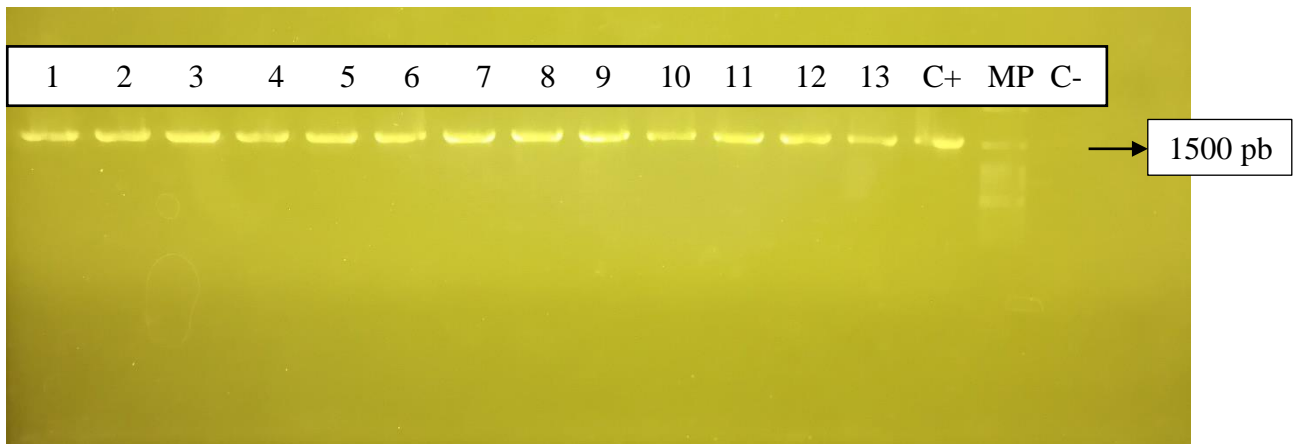


Figura 3. Gel de electroforesis (P) donde se puede observar: control positivo (C+), control positivo (C-), muestras (1-13), marcador de peso 1kb (MP).

Tabla 11. Identificación molecular de bacterias candidatas a probióticos.

Código de Secuenciamiento	Especie identificada	% Similitud
---------------------------	----------------------	-------------

IP5R1	<i>Lactococcus lactis</i>	91.48
HB4(3)	<i>Lactococcus lactis</i>	99.00
IP5(3)	<i>Lactococcus lactis</i>	98.88
HB4(1)	No se logró identificar	-
IP2(6)	<i>Lactococcus lactis</i>	100
HB4(5)	<i>Lactococcus lactis</i>	99.58
HB4(2)	<i>Lactococcus lactis</i>	99.36
HB5(5)	<i>Enterococcus hirae</i>	100
IP2(4)	<i>Lactococcus lactis</i>	99.57
IP5R2	<i>Lactococcus lactis</i>	99.57
IP5(1)	<i>Lactococcus lactis</i>	99.78
IP3(1)	<i>Lactococcus lactis</i>	99.71
IP1(5)	<i>Lactococcus sp.</i>	99.71

Las bacterias aisladas de las branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) mostraron una similitud con *Lactococcus lactis*, *Enterococcus hirae* y las bacterias aisladas del intestino posterior con *Lactococcus lactis* y *Lactococcus sp.* Los resultados tienen similitud a lo descrito en Quevedo, (2020) y Pérez et al., (2011) donde bacterias aisladas del intestino y branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) fueron identificadas a nivel molecular obteniendo *Lactococcus lactis*. Se debe indicar que la mayoría de las bacterias probióticas provienen del género *Enterococcus sp* y *Lactococcus sp*, Gutiérrez, (2016).

Amplias investigaciones describen a *Latococcus lactis* como potencial probiótico, mejorando la salud de diferentes peces, como la trucha arcoíris. Así mismo; *Latococcus lactis* es utilizado como aditivo *in vivo* en el alimento de trucha arcoíris, ofreciendo beneficios al huésped como: baja tasa de conversión alimenticia, rápido crecimiento, óptima segregación de lisozima, estimulación de actividad enzimática, mejores niveles hematológicos, resistencia a enfermedades e inhibidores de bacterias patógenas como: *Lactococcus garviae*, *Yersnia ruckery* y entre otras (Yeganeh et al., 2021; Dawood et al., 2016; Araújo, 2015).

Estudios *in vivo* han demostrado que *Enterococcus hirae* como aditivo en el alimento no generan efectos adversos; al contrario ofrecen beneficios como: óptimo crecimiento, niveles bajos de mortalidad, niveles hematológicos altos y resistencia a enfermedades; sin embargo, *Enterococcus sp.* debido a que diferentes especies de este género están asociados con infecciones graves y resistencia antibiótica, son pocos utilizados como aditivo alimentario; pero diferentes estudios *in vitro* han demostrado que son bacterias sobresalientes por su importante actividad antimicrobiana y potencial probiótico (Hanchi et al., 2018; Hamid et al., 2021).

## V CONCLUSIONES

1. Se aislaron en medio de cultivo MRS, 29 bacterias nativas del intestino posterior e hisopado de branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) en estadio juvenil.
2. Las Siete cepas bacterianas identificadas como: *Lactococcus lactis* y *Lactococcus sp.* presentaron actividad inhibitoria frente a tres patógenos *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactiae* y *Aeromona hydrophila* con halos promedios de inhibición de 6,3 mm, 4,6 mm y 4 mm.
3. Se identificaron usando la técnica PCR 16S rRNA en 14 cepas candidatas a probióticos, en las siguientes cepas bacterianas IP5R1, HB4 (3), IP5 (3), IP2 (6), HB4 (5), HB4 (2), IP2 (4), IP5R2, IP5 (1), IP3 (1) fueron determinadas como *Lactococcus lactis* con un 91,48 % a 100 % de identidad; la cepa HB5 (5) determinada como *Enteroccus hirae* con un 100 % de identidad; la cepa IP1 (5) determinada como *Lactococcus sp.* con 99.71% de identidad y finalmente una cepa no se logró identificar HB4(1).

## VI RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas in vivo con *Enterococcus sp* adicionando la cantidad de  $10^5$  a  $10^8$  ufc/g al alimento balanceado y monitorear los beneficios en el cultivo de *Oncorhynchus mykiss*.
2. Cuantificar los niveles de bacterias probióticas y patógenas durante las pruebas de antagonismo.

## VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Toalá, J. E., Garcia-Varela, R., Garcia, H. S., Mata-Haro, V., González-Córdova, A. F., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, *75*, 105-114. doi:10.1016/j.tifs.2018.03.009
- Austin B. & Austin D.A. (2016) Aerobic Gram-Positive Rods and Cocci. In: *Bacterial Fish Pathogens*. Springer. Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32674-0_3)
- Araújo, C., Muñoz-Atienza, E., Pérez-Sánchez, T., Poeta, P., Igrejas, G., Hernández, P. E., Herranz, C., Ruiz-Zarsuela, I., & Cintas, L. M. (2015). Nisin Z production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* WA2-67 of aquatic origin as a defense mechanism to protect rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Lactococcus garvieae*. *Marine Biotechnology*, *17*(6), 820-830. doi:10.1007/s10126-015-9660-x
- Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary medicine international*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/5432497>
- Bartholomew, J. W., & Mittwer, T. (1952). The gram stain. *Bacteriological reviews*, *16*(1), 1-29. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/br.16.1.1-29.1952>

Bravo, S., & Kojagura, V. (2004). First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 24(2), 104-108.  
[https://www.researchgate.net/publication/293583863\\_First\\_isolation\\_of\\_Yersinia\\_rucker\\_i\\_from\\_rainbow\\_trout\\_Oncorhynchus\\_mykiss\\_in\\_Peu](https://www.researchgate.net/publication/293583863_First_isolation_of_Yersinia_rucker_i_from_rainbow_trout_Oncorhynchus_mykiss_in_Peu)

Castañeda, A. E., Aguilar, J. L., Zatan, A. E., Toledo, O. E., Fera, M. A., & Castillo, D. (2018). Identificación molecular de bacterias ácido lácticas con propiedades probióticas aisladas del intestino posterior de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(4), 429-438.  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2313-29572018000400006&lng=es&nrm=is](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2313-29572018000400006&lng=es&nrm=is)

Castrejón-Nájera, J., Ortega, C., Fajardo, R., Irgang, R., Tapia-Cammas, D., Poblete-Morales, M., & Avendaño-Herrera, R. (2018). Isolation characterization, virulence potential of *Weissella ceti* responsible for weissellosis outbreak in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Mexico. *Transboundary and emerging diseases*, 65(6), 1401-1407. doi: 10.1111/tbed.12978

Cao, Y., Li, S., Han, S., Wang, D., Zhao, J., Xu, L., Liu, H., & Lu, T. (2020). Characterization and application of a novel *Aeromonas* bacteriophage as treatment for pathogenic *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout. *Aquaculture*, 523, 735193.  
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735193>

- Costa, F. A. A., Leal, C. A. G., Schuenker, N. D., Leite, R. C., & Figueiredo, H. C. P. (2014). Characterization of *Weissella ceti* infections in Brazilian rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), farms and development of an oil-adjuvanted vaccine. *Journal of Fish Diseases*, 38(3), 295-302. doi:10.1111/jfd.12236
- Coyle, M., Cavalieri, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., & Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. *Seattle-Washington: American Society for Microbiology*.  
[https://www3.paho.org/spanish/ad/thse/ev/labs\\_susep\\_antimicro.htm](https://www3.paho.org/spanish/ad/thse/ev/labs_susep_antimicro.htm)
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V., Lafaille, A., & Charette, S. J. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary Microbiology*, 169(1-2), 1-7. doi:10.1016/j.vetmic.2013.06.025
- Dawood, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., El Basuni, M. F., Hossain, M. S., Nhu, T. H., Dossou, S., & Moss, A. S. (2016). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*, 49, 275-285. doi.org/10.1016/j.fsi.2015.12.047

- Do Vale Pereira, G., da Cunha, D. G., Pedreira, J. L., Rodiles, A., Jaramillo-Torres, A., & Merrifield, D. L. (2017). Characterization of microbiota in *Arapaima gigas* intestine and isolation of potential probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 123(5), 1298-1311. doi:10.1111/jam.13572
- Dong, J., Liu, Y., Xu, N., Yang, Q., & Ai, X. (2018). Morin protects channel catfish from *aeromonas hydrophila* infection by blocking aerolysin activity. *Frontiers in microbiology*, 9, 2828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02828>
- Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero. (2004). Manual de cultivo de trucha arcoíris en jaulas flotantes. programa de transferencia de tecnología en acuicultura para pescadores artesanales y comunidades campesinas. *Edición, junio 2004*. 1-120. [http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manua\\_trucha\\_jaulas.pdf](http://www2.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/manua_trucha_jaulas.pdf)
- Fondo Nacional de Desarrollos Pesquero. (2014). Manual de crianza de trucha arcoíris en ambientes convencionales. *Edición, octubre 2014*. 1-71. [https://www.fondepes.gob.pe/src/manuales/MANUAL\\_TRUCHA.pdf](https://www.fondepes.gob.pe/src/manuales/MANUAL_TRUCHA.pdf)
- Gutiérrez, L. A. (2016). *Caracterización de cepas de Bacillus sp y Bacterias ácido lácticas con actividad probiótica en el tracto digestivo de Tilapia roja (Oreochromis sp) como potencial consorcio para procesos de microencapsulación*. (Tesis de doctorado, Universidad Nacional de Colombia). <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56859>

Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. (2018). The genus *Enterococcus*: between probiotic potential and safety concerns—an update. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1791. doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791

Hamid, N. H., Daud, H. M., Kayansamruaj, P., Hassim, H. A., Yusoff, M. S. M., Bakar, S. N. A., & Srisapoome, P. (2021). Short-and long-term probiotic effects of *Enterococcus hirae* isolated from fermented vegetable wastes on the growth, immune responses, and disease resistance of hybrid catfish (*Clarias gariepinus* × *Clarias macrocephalus*). *Fish & Shellfish Immunology*, *114*, 1-19. doi.org/10.1016/j.fsi.2021.04.012

Hoseinifar, S., Sun, Y., Wang, A., & Zhou, Z. (2018). Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2429. doi.org/10.3389/fmicb.2018.02429

Instituto Tecnológico Pesquero. (2008). Procedimiento: Control de residuos de medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas y plaguicidas en la acuicultura PR-DSANIPES/CSMAA-02.

[http://www.sanipes.gob.pe/procedimientos/13\\_ControldeResiduosdemedicamentosveterinariosustanciasprohibidasylaguicidasenlaacuicultura.compressed.pdf](http://www.sanipes.gob.pe/procedimientos/13_ControldeResiduosdemedicamentosveterinariosustanciasprohibidasylaguicidasenlaacuicultura.compressed.pdf)

- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73. doi:10.1128/cmr.00039-09
- Keene, J. L., Noakes, D. L. G., Moccia, R. D., & Soto, C. G. (1998). The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 29(2), 89-101. doi:10.1046/j.1365-2109.1998.00927.x
- Kumar, G., Menanteau-Ledouble, S., Saleh, M., & El-Matbouli, M. (2015). *Yersinia ruckeri*, the causative agent of enteric redmouth disease in fish. *Veterinary research*, 46(1), 1-10. doi:10.1186/s13567-015-0238-4
- León, J., Ávalos, R., & Ponce, M. (2008). *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Oncorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Revista peruana de biología*, 15(2), 117-124. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332008000200019](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332008000200019)
- MacCrimmon, H. R. (1971). World Distribution of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 28(5), 663–704. doi:10.1139/f71-098
- Martínez, P., Ibáñez, A. L., Monroy, O. A., & Ramírez, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Notices*, 2012. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>

- Medina, M., Fernández-Espinel, C., Sotil, G., Yunis-Aguinaga, J., & Flores-Dominick, V. (2020). First description of *Weissella ceti* associated with mortalities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Perú. *Aquaculture*, 529, 735608. doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.735608
- Ministerio de la producción. (2018). Anuario estadístico pesquero y acuícola 2017. *Edición, diciembre 2018*. 144-154. <https://ogeiee.produce.gob.pe/index.php/en/shortcode/oeedocumentos-publicaciones/publicaciones-anuales/item/825-anuario-estadistico-pesquero-y-acuicola-2017>
- Mora-Sánchez, B., Balcázar, J. L., & Pérez-Sánchez, T. (2020). Effect of a novel postbiotic containing lactic acid bacteria on the intestinal microbiota and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biotechnology Letters*, 42, 1957-1962. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10529-020-02919-9>
- Mondal, S., Roy, T., & Ray, A. K. (2010). Characterization and identification of enzyme-producing bacteria isolated from the digestive tract of bata, *Labeo bata*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(3), 369-377. doi:10.1111/j.1749-7345.2010.00378.x
- Muñoz-Atienza, E., Távara, C., Díaz-Rosales, P., Llanco, L., Serrano-Martínez, E., & Tafalla, C. (2019). Local regulation of immune genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

naturally infected with *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 86, 25–34. doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.027

Organización Mundial de Sanidad Animal. (2019). Lista de los agentes antimicrobianos importantes para la Medicina Veterinaria. *Edición, julio 2019*. 1-9. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/AMR/E\\_OIE\\_Lista\\_antimicrobianos\\_Julio2019.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Our_scientific_expertise/docs/pdf/AMR/E_OIE_Lista_antimicrobianos_Julio2019.pdf)

Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2021). Protocolo técnico para registro sanitario de piensos y productos veterinarios de uso en la acuicultura n° ptrsi-pv-005-21-sanipes. <https://www.sanipes.gob.pe/web/index.php/es/acuicultura-registro-sanitario>

Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2020a). Informe de sanidad acuícola. Informe de la subdirección de sanidad acuícola 2017-2019. *Edición, mayo 2020*. 1-162. <https://www.sanipes.gob.pe/difusion-informe-sanidad-acuicola/archivos/INFORME-DE-SANIDAD-APROBADO-JUNIO-2020.pdf>

Organismo Nacional de Sanidad Pesquera. (2020b). Protocolo técnico para registro sanitario de piensos y productos veterinarios de uso en la acuicultura n° ptrsi-pv-004-20-sanipes. [http://www.sanipes.gob.pe/archivos/registro\\_sanitario/veterinarios/56\\_20200715\\_083007317.pdf](http://www.sanipes.gob.pe/archivos/registro_sanitario/veterinarios/56_20200715_083007317.pdf)

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (2020). El estado mundial de la pesca y acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma, Italia. doi.org/10.4060/ca9229es

Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (2021). Declaración de 2021 del comité de pesca en favor de la pesca y la acuicultura sostenibles. Roma, Italia. <https://doi.org/10.4060/cb3767es>

Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., De Blas, I., Merrifield, D. L., & Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of fish diseases*, 34(7), 499-507. doi:10.1111/j.1365-2761.2011.01260.x

Quevedo, K. G. (2020). *Aislamiento y caracterización de Lactobacillus sp con potencial probiótico in vitro frente a patógenos de trucha arcoíris*. (Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia). [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/7752/Aislamiento\\_QuevedoOlaya\\_Karol.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/7752/Aislamiento_QuevedoOlaya_Karol.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Quispe, W. (2017). *Aislamiento de Lactobacillus sp. de "Trucha Arco Iris" Oncorhynchus mykiss con potencial probiótico frente a Yersinia ruckeri en puno*. (Tesis de licenciado, Universidad Nacional de Altiplano).

[http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5360/Quispe\\_Gallegos\\_Wilson\\_Reinaldo.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5360/Quispe_Gallegos_Wilson_Reinaldo.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Reda, R. M., Selim, K. M., El-Sayed, H. M., & El-Hady, M. A. (2018). In vitro selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *10*(4), 692-703. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-017-9314-6>

Ringø, E., Hoseinifar, S. H., Ghosh, K., Doan, H. V., Beck, B. R., & Song, S. K. (2018). Lactic acid bacteria in finfish—An update. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1818. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01818>

Robertson, P. A. W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., & Austin, B. (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*, *185*(3-4), 235-243. [doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00349-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00349-X)

Rijkers, G. T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Antoine, J. M. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research. *The Journal of Nutrition*, *140*(3), 671S–676S. doi:10.3945/jn.109.113779

- Ross, A. J., Rucker, R. R., & Ewing, W. H. (1966). Description of a bacterium associated with redmouth disease of rainbow trout (*Salmo gairneri*). *Canadian journal of microbiology*, 12(4), 763-770. doi:10.1139/m66-103
- Rodríguez M. (2009). *Aislamiento y selección de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiótica e inmunomoduladora*. (Tesis de doctorado, Universidad Autónoma de Barcelona). España. <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3931/mrg1de1.pdf>
- Starliper, C. E. (2011). Bacterial coldwater disease of fishes caused by *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Advanced Research*, 2(2), 97-108. doi.org/10.1016/j.jare.2010.04.001
- Trudel, M. V., Vincent, A. T., Attéré, S. A., Labbé, M., Derome, N., Culley, A. I., & Charette, S. J. (2016). Diversity of antibiotic-resistance genes in Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*: dominance of pSN254b and discovery of pAsa8. *Scientific reports*, 6(1), 1-10. <https://www.nature.com/articles/srep35617>
- Wrobel, A., Leo, J.C., & Linke, D. (2019). Overcoming fish defences: the virulence factors of *Yersinia ruckeri*. *Genes*, 10(9), 700. doi:10.3390/genes10090700.
- Xia, Y., Wang, M., Gao, F., Lu, M., & Chen, G. (2019). Effects of dietary probiotic supplementation on the growth, gut health and disease resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Nutrition*, 6(1), 69-79. doi.org/10.1016/j.aninu.2019.07.002

Yeganeh, S., Adel, M., Nosratimovafagh, A., & Dawood, M. A. (2021). The Effect of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* PTCC 1403 on the Growth Performance, Digestive Enzymes Activity, Antioxidative Status, Immune Response, and Disease Resistance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1-11. doi.org/10.1007/s12602-021-09787-3

Zatán, A. E., Castillo, D., Castañeda, A. E., Fera, M. A., Toledo, O. E., Aguilar, J. L., Cueva, M. D., & Motte, E. (2020). Caracterización de la microbiota intestinal en robalo (*Centropomus* sp) y aislamiento de bacterias probióticas potenciales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(3). <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/16036>

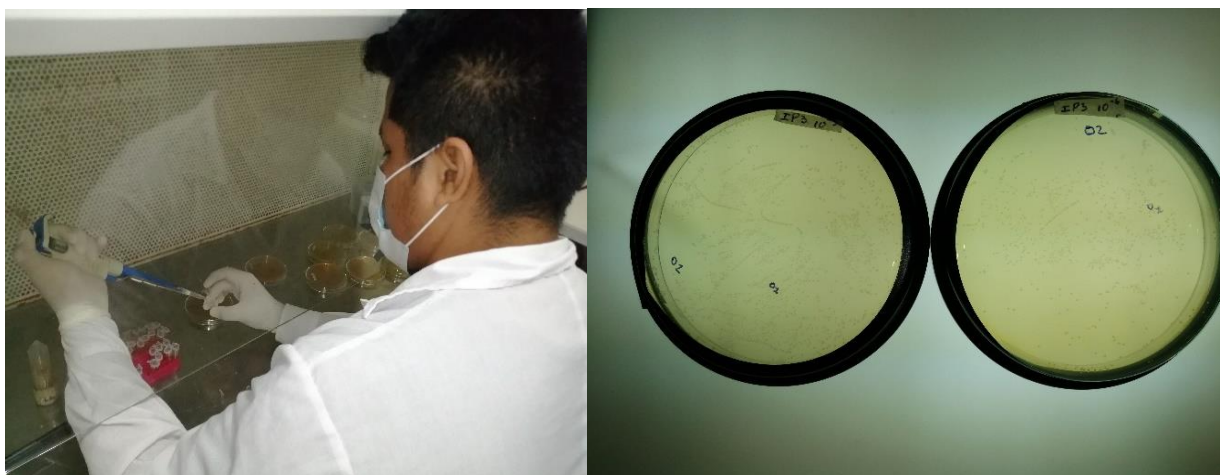
## VIII ANEXOS

Anexo 1. Resultados de tinción de Gram, catalasa y oxidasa.

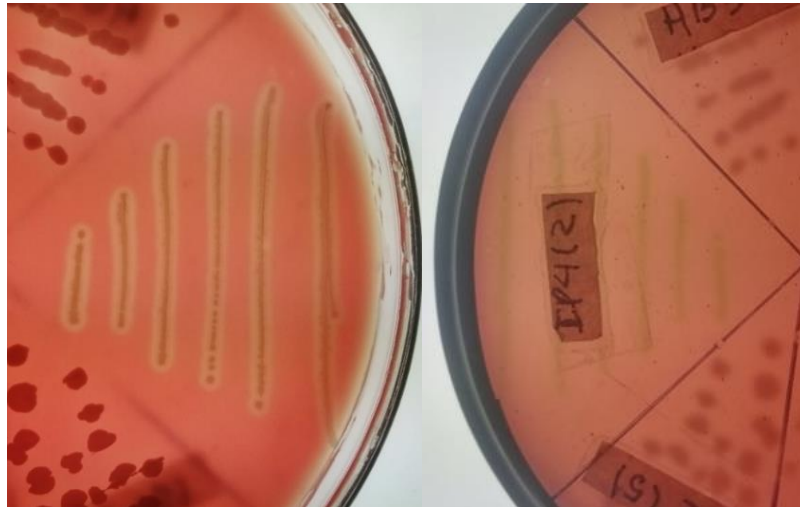
N°	Código	Verificación	Descripción	Tinción Gram	Catalasa	Oxidasa
1	HB4(3)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
2	HB4(1)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
3	HB5(5)	Sin contaminacion	Coccos	Positivo	Negativo	Negativo
4	IPI (3)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
5	HB4(4)	Sin contaminacion	Coccos	Negativo	Negativo	Negativo
6	IPI (5)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
7	HB3(4)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
8	HB4(2)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
9	IP2(2)	Sin contaminacion	Coccos	Positivo	Negativo	Negativo
10	HB3(3)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
11	HB5(3)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
12	IP2(4)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
13	IP2(6)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
14	HB4(5)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
15	IP5(2)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
16	IP5(R2)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
17	IP5(3)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
18	IP2(5)	Sin contaminacion	Cocos	Positivo	Positivo	Negativo

19	IP4(2)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
20	IP3(1)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
21	HB3(1)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
22	IP5(1)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
23	HB5(6)	Sin contaminacion	Cocos	Positivo	Positivo	Negativo
24	HB5(2)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
25	HB3(2)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
26	HB3(5)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
27	HB5(4)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo
28	IP5R1	Sin contaminacion	Coccobacillus	Positivo	Negativo	Negativo
29	HB5(1)	Sin contaminacion	Coccobacillus	Negativo	Negativo	Negativo

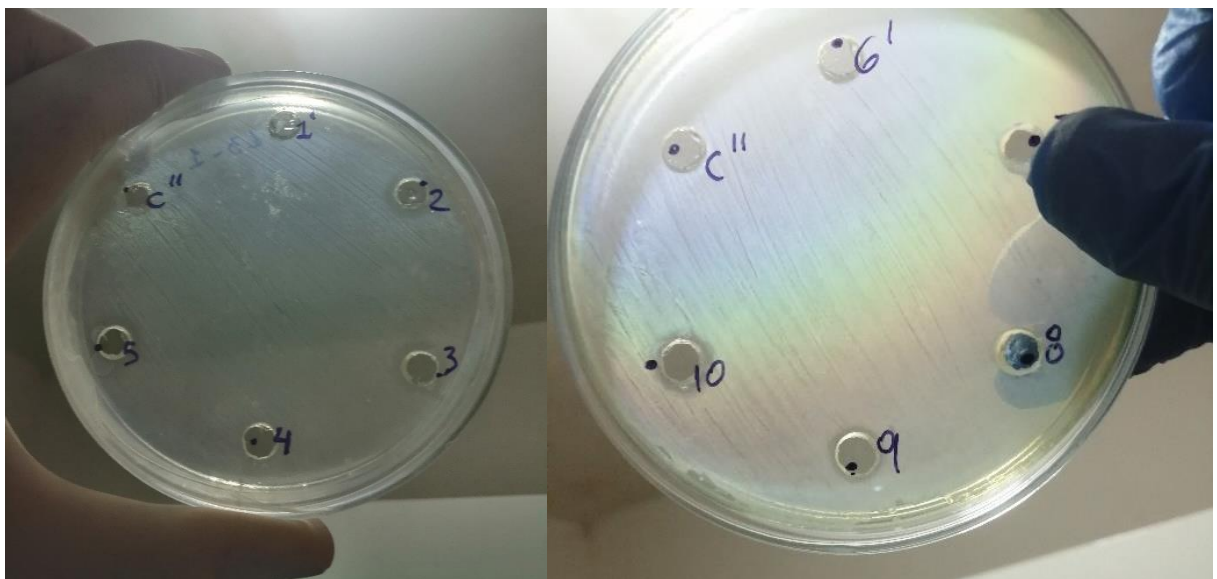
Anexo 2. Selección y purificación de bacterias candidatas a probióticos.



Anexo 3. Muestras positivas del ensayo hemolítico,  $\beta$ -hemólisis y  $\alpha$ -hemólisis.



Anexo 4. Capacidad inhibitoria de bacterias candidatas a probióticos frente a bacterias patógenas, utilizando la técnica de pocillos.



Anexo 5. Muestras positivas de la enzima proteasa

